

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局(43) 国際公開日  
2004 年 9 月 23 日 (23.09.2004)

PCT

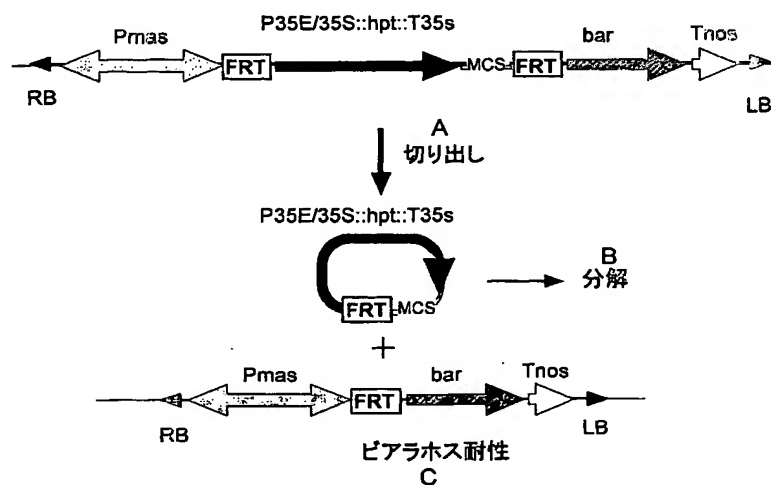
(10) 国際公開番号  
WO 2004/081211 A1

- (51) 国際特許分類<sup>7</sup>: C12N 15/09, 15/82, 5/14, A01H 5/00 (72) 発明者; および  
(21) 国際出願番号: PCT/JP2004/003069 (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 土岐 精一 (TOKI, Seichi) [JP/JP]; 〒3058602 茨城県つくば市観音台 2-1-2 独立行政法人 農業生物資源研究所内 Ibaraki (JP). 市川 裕章 (ICHIKAWA, Hiroaki) [JP/JP]; 〒3058602 茨城県つくば市観音台 2-1-2 独立行政法人 農業生物資源研究所内 Ibaraki (JP). 刑部 敬史 (OSAKABE, Keishi) [JP/JP]; 〒3050035 茨城県つくば市松代 5-2-29 つくばアイビースクエア 502 Ibaraki (JP).  
(22) 国際出願日: 2004 年 3 月 10 日 (10.03.2004)  
(25) 国際出願の言語: 日本語  
(26) 国際公開の言語: 日本語  
(30) 優先権データ: 特願2003-067173 2003 年 3 月 12 日 (12.03.2003) JP (74) 代理人: 清水 初志, 外 (SHIMIZU, Hatsushi et al.); 〒3000847 茨城県土浦市卸町 1-1-1 関鉄つくばビル 6 階 Ibaraki (JP).  
(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 独立行政法人 農業生物資源研究所 (NATIONAL INSTITUTE OF AGROBIOLOGICAL SCIENCES) [JP/JP]; 〒3058602 茨城県つくば市観音台 2 丁目 1-2 Ibaraki (JP). (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,

[続葉有]

(54) Title: TECHNIQUE OF REMOVING MARKER GENE BY TRANSIENT EXPRESSION OF SITE-SPECIFIC RECOMBINASE GENE

(54) 発明の名称: 部位特異的組換え酵素遺伝子の一過的発現によるマーカー遺伝子の除去技術



A...EXCISION  
B...DEGRADATION  
C...BIALAPHOS-TOLERANCE

(57) Abstract: It is estimated that a marker gene could be efficiently and conveniently removed by transiently overexpressing a site-specific recombinase gene by the Floral dip method. It appears that this method is applicable to a method of transferring a transposon free from transposon transferase from a recombinant plant carrying the transposon free from transposon transferase.

(57) 要約: 部位特異的組み換え酵素遺伝子をFloral dip法により一過的に高発現させることで、マーカー遺伝子を効率的かつ簡便に除去できるのではないかと考えた。この方法は、トランスポゾン転位酵素を持たないトランスポゾン有する形質転換植物体から該トランスポゾン転位酵素を持たないトランスポゾンを転位する方法にも応用できるものと考えられる。



DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY,

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 *PCT* ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

- 1 -

## 明細書

部位特異的組換え酵素遺伝子の一過的発現によるマーカー遺伝子の除去技術

5 技術分野

本発明は、部位特異的組換え酵素認識配列に挟まれたDNAを有する形質転換植物体から該DNAを効率的かつ簡便に除去する方法に関する。さらに、本発明は、トランスポゾン転位酵素を持たないトランスポゾン有する形質転換植物体から該トランスポゾン転位酵素を持たないトランスポゾンを効率的かつ簡便に転位する方法に関する。

背景技術

ゲノムDNA中に挿入されたマーカー遺伝子を除去する方法として、マーカー遺伝子の両端に部位特異的組換え酵素認識配列を配置し、部位特異的組換え酵素によりマーカー遺伝子を切り出し除去することが考案されている。則ち、部位特異的組換え酵素認識配列を付加したマーカー遺伝子を持つ個体と部位特異的組換え酵素遺伝子を導入した個体をかけ合わせることによりマーカー遺伝子の切り出し除去を行う方法（非特許文献1）、予めマーカー遺伝子と誘導性プロモーターによりコントロールされる部位特異的組換えタンパク遺伝子を一緒に部位特異的組換え酵素認識配列の内側に配置し形質転換し、必要な時に部位特異的組換え酵素の発現を誘導することによってマーカー遺伝子の切り出し除去を行う方法（非特許文献2）である。しかしながら上記の2つの方法においては、部位特異的組換え酵素の発現量が充分でなく切り出し除去の効率が極めて低いことが問題点であった。また非特許文献2に記載の方法においては部位特異的組換え酵素の発現を完全に抑制することは現状では困難であり、形質転換処理後、マーカー遺伝子を利用した形質転換体選抜中に、部位特異的組換え酵素の作用により、マーカー遺

- 2 -

伝子が抜け落ちる可能性が高い事が問題であった。

しかしながら、これまでに、in planta transformation法により、部位特異的組換え酵素遺伝子を一過的に高発現させて、マーカー遺伝子を効率的かつ簡便に除去できる方法については知られていなかった。

5 尚、本出願の発明に関連する先行技術文献情報を以下に示す。

〔非特許文献1〕 Onouchi H et al. Visualization of site-specific recombination catalyzed by a recombinase from *Zygosaccaromyces rouxii* in *Arabidopsis thaliana*. (1995) Mol. Gen. Genet. 247, 653-660

10 〔非特許文献2〕 Sugita K et al. A transformation vector for production of marker-free transgenic plants containing a single copy transgene at high frequency. Plant J. (2000) 22, 461-469

#### 発明の開示

15 本発明は、このような状況に鑑みてなされたものであり、その目的は、部位特異的組換え酵素認識配列に挟まれたDNAを有する形質転換植物体から該DNAを効率的かつ簡便に除去する方法を提供することにある。さらに、本発明は、トランスポゾン転位酵素を持たないトランスポソンを有する形質転換植物体から該トランスポゾン転位酵素を持たないトランスポソンを効率的かつ簡便に転位する方法を提供することもまた目的とする。

20 本発明者らは、Ye, G.-N. ら (Guang-Ning Ye et al. (1999) Plant J 19 (3), 249-257.) の論文を精査し、vacuum infiltration法 (in planta transformation 法の一つ) によりGUS遺伝子を導入した場合、一過的にはGUS遺伝子の非常に強い発現がアラビドプシス植物体で観察されることに気がついた。一方、Hodgesらのグループ (Lyznik LA et al. (1993) Nucleic Acids Res 25, 21(4), 969-97  
25 5.) は形質転換トウモロコシ由来のプロトプラストにおいてFLP遺伝子を一過的に発現させることにより、特異的認識配列であるFRTにはさまれた配列の切り出

- 3 -

しが行える事を報告していた。

そこで本発明者らは、in planta transformation法の一つであるFloral dip法により外来遺伝子が一過的には胚発生の初期に強く発現する事を利用し、部位特異的組換え酵素遺伝子を一過的に高発現させることで、マーカー遺伝子を効率的かつ簡便に除去できるのではないかと考えた。

まず、部位特異的組み換えタンパク質として出芽酵母由来のFLP recombinaseを利用し、その認識配列であるFRT配列をハイグロマイシン抵抗性遺伝子カセットの両外側に配置したコンストラクトを作製した。このコンストラクトではFRT配列のさらに外側にはマンノピン合成酵素遺伝子のプロモーターとビアラホス耐性遺伝子を配置した。原理的にFLPによりFRT配列間が除去されればマンノピン合成酵素遺伝子のプロモーターとビアラホス耐性遺伝子が近接しビアラホス耐性を付与する。次いで、本発明者らは、pK0101を保持する*A. tumefaciens* EHA105株を用いて、Floral dip法により形質転換アラビドプシス植物体を作製した。pK0101の導入されたアラビドプシス植物体に対して、初期胚特異的プロモーターで働くFLPを保持する*A. tumefaciens* EHA105株を用いてFloral dip法を適用し、ビアラホス耐性を指標にして、ハイグロマイシン抵抗性遺伝子が効率よく除去されるか否かを検討できる。

また、この方法は、トランスポゾン転位酵素を持たないトランスポゾンを有する形質転換植物体から該トランスポゾン転位酵素を持たないトランスポゾンを転位する方法にも応用できるものと考えられる。

即ち、本発明は、以下の〔1〕～〔6〕を提供するものである。

〔1〕 部位特異的組換え酵素をコードするDNAを、部位特異的組換え酵素認識配列に挟まれたDNAを有する形質転換植物体に、*Agrobacterium*を介して導入することにより、該部位特異的組換え酵素を一過的に発現させる工程を含む、該部位特異的組換え酵素認識配列に挟まれたDNAの除去方法。

〔2〕 〔1〕に記載の方法により、部位特異的組換え酵素認識配列に挟まれたDN

- 4 -

Aが除去された形質転換植物体。

〔3〕 トランスポゾン転位酵素をコードするDNAを、トランスポゾン転位酵素を持たないトランスポゾン有する形質転換植物体に、*Agrobacterium*を介して導入することで、トランスポゾン転位酵素を一過的に発現させる工程を含む、該トランスポゾン転位酵素を持たないトランスポゾンの転位方法。

〔4〕 〔3〕に記載の方法により、トランスポゾン転位酵素を持たないトランスポゾンが転位した形質転換植物体。

〔5〕 〔2〕または〔4〕に記載の形質転換植物体の子孫またはクローンである、形質転換植物体。

〔6〕 〔2〕、〔4〕または〔5〕に記載の形質転換植物体の繁殖材料。

本発明者らは、部位特異的組換え酵素をコードするDNAを、部位特異的組換え酵素認識配列に挟まれたDNAを有する形質転換植物体に、*Agrobacterium*（アグロバクテリウム）を介して導入することにより、該部位特異的組換え酵素を一過的に発現させる工程を含む、該部位特異的組換え酵素認識配列に挟まれたDNAの除去方法を提供する。この方法は、従来の方法と比較して、部位特異的組み換え酵素認識配列に挟まれたDNAを高効率に除去できる方法である。また、この方法は、組織培養を必要としないので従来の方法と比較して非常に簡便な方法である。さらに、この方法は、所望の植物に適用できると考えられ、その利用範囲は極めて広いと考えられる。

本発明において、部位特異的組換え酵素とは、部位特異的組換えの過程、即ちDNAの分子内あるいは分子間の特定部位で起こる組換えの過程を触媒する酵素を意味する。また、部位特異的組み換え酵素認識配列とは、部位特異的組み換え酵素の認識配列である40塩基対程の配列を意味する。部位特異的組換え酵素は認識配列に挟まれたDNA断片を切り出し環状化させる機能を持つが、逆の反応（環状分子を認識配列を介して挿入する）も行う。

本発明における部位特異的組換え酵素としては、特に制限はないが、例えばFR

- 5 -

T配列を認識する出芽酵母由来のFLP recombinase、味噌醤油酵母 (*Zygosaccharomyces rouxii*) 由来のR/RSシステムにおけるRS配列を認識する酵素R (Onouchi H et al. (1995) Mol. Gen. Genet. 247, 653-660、Onouchi H et al. (1991) Nucl. Acids Res. 19, 6373-6378)、bacteriophage P1由来のCre/loxシステムに  
5 おけるlox配列を認識する酵素Cre (Albert H et al. (1995) Plant J. 7, 649-659、Liu Q et al. (1998) Current Biol. 8, 1300-1309、Abmemski K et al. (1983) Cell 32, 1301-1311) などが例示できる。

本発明において、部位特異的組換え酵素認識配列に挟まれたDNAとしては、好ましくはマーカー遺伝子が挙げられるが、これに限定されるものではない。該マ  
10 ーカー遺伝子としては、特に制限はなく、カナマイシン耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子、ピアラヒス耐性遺伝子などの薬剤耐性遺伝子、GUS遺伝子、GFP遺伝子などの蛍光遺伝子などが例示できる。

また、本発明における*Agrobacterium*としては、特に制限はなく、例えば、*Agrobacterium tumefaciens* EHA105が例示できる。

15 本発明における「部位特異的組換え酵素認識配列に挟まれたDNAを有する形質転換植物体」は、例えば、部位特異的組換え酵素認識配列に挟まれたDNAを植物細胞に導入し、該植物細胞から植物体を再生させることで作製できる。

本発明において、植物細胞の形質転換に用いられるベクターは、該細胞内で挿入DNAを発現させることが可能なものであれば特に制限はない。例えば、植物細胞  
20 内で恒常的に遺伝子を発現させるためのプロモーター（例えば、カリフラワーモザイクウイルスの35Sプロモーター）を有するベクターや、外的な刺激により誘導的に活性化されるプロモーターを有するベクターを用いることもできる。ここで言う「植物細胞」には、種々の形態の植物細胞、例えば、懸濁培養細胞、プロトプラスト、葉の切片、カルスなどが含まれる。

25 植物細胞へのベクターの導入には、ポリエチレングリコール法、電気穿孔法（エレクトロポレーション法）、アグロバクテリウムを介する方法、パーティク

- 6 -

ルガン法など、当業者に公知の種々の方法を用いることができる。パーティクルガン法においては、例えば、バイオラッド社のものを用いることが可能である。形質転換植物細胞からの植物体の再生は、植物細胞の種類に応じて当業者に公知の方法で行うことが可能である (Toki S, et al., Plant Physiol., 100: 1503, 5 1992)。

例えば、イネにおいて形質転換植物体を作製する手法については、ポリエチレングリコールを用いてプロトプラストへ遺伝子導入し、植物体 (インド型イネ品種が適している) を再生させる方法 (Datta SK: In Gene Transfer To Plants (Potrykus I and Spangenberg, Eds) pp.66-74, 1995)、電気パルスによりプロトプラストへ遺伝子導入し、植物体 (日本型イネ品種が適している) を再生させる方法 (Toki S, et al., Plant Physiol., 100: 1503, 1992)、パーティクルガン法により細胞へ遺伝子を直接導入し、植物体を再生させる方法 (Christou P, et al., Biotechnology 9: 957, 1991)、および *Agrobacterium* を介して遺伝子を導入し、植物体を再生させる方法 (例えば、単子葉植物の超迅速形質転換法 (特許第3141084号)) など、いくつかの技術が既に確立し、本願発明の技術分野において広く用いられている。本発明においては、これらの方法を好適に用いることができる。

また、本発明における「部位特異的組換え酵素認識配列に挟まれたDNAを有する形質転換植物体」は、例えば、後述の方法により、部位特異的組換え酵素認識配列に挟まれたDNAを、intactな植物体に直接的に導入することで作製できる。

本発明においては、このように作製された部位特異的組換え酵素認識配列に挟まれたDNAを有する形質転換植物体に、部位特異的組換え酵素をコードするDNAを、*Agrobacterium* を介して導入する。これによって、部位特異的組換え酵素が一過的に発現し、部位特異的組換え酵素認識配列に挟まれたDNAが除去される。

本発明において、部位特異的組み換え酵素認識配列に挟まれたDNAを有する形質転換植物体に、部位特異的組換え酵素をコードするDNAを、*Agrobacterium* を介



- 7 -

して導入する方法としては、in planta transformation法を好適に用いることができる。

ここで、in planta transformation法とは、植物からカルス誘導やプロトプラスト単離等を行わずに、intactな植物体に直接遺伝子導入を行う方法を意味する。

- 5 特にアラビドプシスで開発された方法は蕾の時期の植物体の花序をアグロバクテリウム菌液に浸すだけで形質転換を行う方法で極めて簡便な方法である（vacuum infiltration法の場合は浸した後に減圧処理を行う）。形質転換（遺伝子の導入）は卵細胞に対して行われると考えられており、自殖種子の0.1～0.5%が形質転換種子となる。

- 10 本方法は従来の方法と比べ組織培養を経ない形質転換法のため、somaclonal variation(体細胞突然変異)を誘発する可能性が低く、また操作が極めて簡便で形質転換体を得られるまでの期間が短いという利点がある。

- 本発明において、in planta transformation法（Bent A.W. Arabidopsis in P  
lanta Transformation. Uses, Mechanisms, and Prospects for Transformation  
15 of Other Species. (2000) Plant Physiology 124, 1540-1547）としては、Floral dip法、vacuum infiltration法、Incision/Inoculation法、アグロバクテリウム菌液をスプレーして感染するFloral spray法（Chung MH et al. (2000) Transgenic Res. 9(6) 471-476）などが例示できるが、これらに限定されるものではない。

- 20 本発明において、部位特異的組換え酵素認識配列に挟まれたDNAが除去されたか否かは、該DNAが薬剤耐性遺伝子や蛍光遺伝子であれば、部位特異的組換え酵素をコードするDNAが導入された形質転換植物体、該形質転換植物体の細胞、または、該形質転換植物体の種子などの薬剤耐性能の消失や蛍光の消失、また、サザン法、PCR法などで判断することができる。

- 25 また、トランスポーゼス（転位酵素）が特異的な配列を認識してトランスポゾンを取り出す過程は部位特異的組み換え酵素がその認識配列を取り出す過程と類

- 8 -

似していることから、本発明者らは、トランスポゾン転位酵素をコードするDNAを、トランスポゾン転位酵素を持たないトランスポゾンを有する形質転換植物体に、*Agrobacterium*を介して導入することで、トランスポゾン転位酵素を一過的に発現させる工程を含む、該トランスポゾン転位酵素を持たないトランスポゾンの転位方法を提供する。

トランスポゾンによる遺伝子のタギングは現在主として2成分系で行われている。この方法はトランスポーゼスを持たないトランスポゾン（非自立的トランスポゾン）を有する植物体とトランスポーゼスが発現している植物体を交配して、非自立的トランスポゾンを転移させ、また、再度転移しない様に次世代でトランスポーゼス遺伝子を分離させる方法であり、多大な労力と時間を必要としている。これに対して本発明の方法はトランスポーゼスをコードするDNAを、非自立的トランスポゾンを有する植物体に、*Agrobacterium*を介して導入することで、トランスポーゼスを一過的に発現させ、非自立的トランスポゾンを転移させる方法であり、高効率の転移が期待され、また、次世代でトランスポーゼス遺伝子を分離させる必要もない。

本発明におけるトランスポゾン転位酵素としては、特に制限はないが、例えばトウモロコシのAc/Ds系が挙げられる。

本発明における「トランスポゾン転位酵素を持たないトランスポゾンを有する形質転換植物体」は、例えば、トランスポゾン転位酵素を持たないトランスポゾンを植物細胞に導入し、該植物細胞から植物体を再生させること、また、in planta transformation法により、トランスポゾン転位酵素を持たないトランスポゾンを植物体に導入することで作製できる。本発明においては、このように作製されたトランスポゾン転位酵素を持たないトランスポゾンを有する形質転換植物体に、トランスポゾン転位酵素をコードするDNAを、*Agrobacterium*を介して導入する。これによって、トランスポゾン転位酵素が一過的に発現し、トランスポゾン転位酵素を持たないトランスポゾンが転位する。

- 9 -

部位特異的組み換え酵素認識配列に挟まれたDNAを有する形質転換植物体から該DNAが除去された形質転換植物体や、転位酵素を持たないトランスポゾンを含む形質転換植物体から該転位酵素を持たないトランスポゾンが転位した形質転換植物体がいったん得られれば、該植物体から有性生殖または無性生殖により子孫を得ることができる。また、該植物体やその子孫あるいはクローンから繁殖材料（例えば、種子、果実、切穂、塊茎、塊根、株、カルス、プロトプラストなど）を得て、それらを基に該植物体を量産することも可能である。

#### 図面の簡単な説明

10 図1は、本発明に用いたベクターを示す図である。(A)はpK0101を示し、(B)はpSkl-1-FLP (アラビドプシス用 FLP一過的発現用)を示す。

図2は、FLPによるFRT配列間の切り出しを示す図である。FLPの一過的発現によってFRT配列間が切り出されると、ゲノム中に残されたmasプロモーターとbar遺伝子が連結し植物体はピアラホス耐性となる。一方、切り出されたDNA断片は細胞中で複製できずに分解されハイグロマイシン耐性を失う。

#### 発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を実施例により、さらに具体的に説明するが本発明はこれら実施例に制限されるものではない。

##### 20 [1] pK0101、FLP遺伝子一過的発現ベクターの作製

部位特異的組み換え酵素として出芽酵母由来のFLP recombinase (pOG44, Invitrogen) を用い、その認識配列であるFRT配列をハイグロマイシン抵抗性遺伝子カセット (CaMV35sプロモーター+ハイグロマイシン抵抗性遺伝子+CaMV35sターミネーター) の両外側に配置したコンストラクトを作製した(図1 A)。このコンストラクトではFRT配列のさらに外側にはマンノシン合成酵素遺伝子のプロモーターとピアラホス耐性遺伝子を配置し、FLPの働きによりFRT配列に挟まれたハイグ

- 10 -

ロマイシン抵抗性遺伝子カセットが抜けることにより、ビアラホス耐性遺伝子が発現する事が期待される（図2）。また、FLP遺伝子が発現させるために図1に示したバイナリーベクター(pSkp-1FLP)を作製した(図1B)。上記のベクターは*Agrobacterium tumefaciens* EHA105にエレクトロポレーション法により導入した。

## 5 [2] アラビドプシスの形質転換

pK0101を保持する*A. tumefaciens* EHA105を用いてFloral dip法(Clough, S. J. and Bent, A. F. (1998). Plant J. 16, 735-743.)により*Arabidopsis thaliana* ecotype Col-0を形質転換した。得られた形質転換種子は20 mg/Lの濃度のハイグロマイシンを含む0.4% ゲルライトを固化剤としたMS培地(Murashige, T. and Skoog, F. (1962) Physiol. Plant. 15, 473-497.)上に播種し、ハイグロマイシンを含む培地上で生育してきた植物体を形質転換植物体の候補として実験に用いた。

## [3] FLP遺伝子の一過的発現によるマーカー遺伝子の除去

[2]で得られたpK0101導入アラビドプシス形質転換植物体に対して、Floral dip法によりpSkp-1FLPを保持する*A. tumefaciens* EHA105を感染させFLP遺伝子を一過的に発現させる。FLP遺伝子の一過的発現によってFRT配列間が切り出されると、ゲノム中に残されたmasプロモーターとbar遺伝子が連結し植物体はビアラホス耐性となる。従って、FLP遺伝子の一過的発現によってビアラホス耐性を示す植物体が効率よく得られたときに、ハイグロマイシン抵抗性遺伝子が効率よく除去されたと判断される。

## 産業上の利用の可能性

本発明によって、部位特異的組み換え酵素認識配列に挟まれたDNAを有する形質転換植物体から該DNAを効率的かつ簡便に切り出し除去を行うことが可能となる。さらに、転位酵素を持たないトランスポゾンを持つ形質転換植物体から該転位酵素を持たないトランスポゾンを効率的かつ簡便に転位させることが可能と

- 11 -

なる。これらの方法は、所望の植物に適用できると考えられ、その利用範囲は極めて広いと考えられる。

- 1 2 -

請求の範囲

1. 部位特異的組換え酵素をコードするDNAを、部位特異的組換え酵素認識配列に挟まれたDNAを有する形質転換植物体に、*Agrobacterium*を介して導入することにより、該部位特異的組換え酵素を一過的に発現させる工程を含む、該部位特異的組換え酵素認識配列に挟まれたDNAの除去方法。  
5
2. 請求項 1 に記載の方法により、部位特異的組換え酵素認識配列に挟まれたDNAが除去された形質転換植物体。
3. トランスポゾン転位酵素をコードするDNAを、トランスポゾン転位酵素を持たないトランスポゾンを持つ形質転換植物体に、*Agrobacterium*を介して導入することで、トランスポゾン転位酵素を一過的に発現させる工程を含む、該トランスポゾン転位酵素を持たないトランスポゾンの転位方法。  
10
4. 請求項 3 に記載の方法により、トランスポゾン転位酵素を持たないトランスポゾンが転位した形質転換植物体。
5. 請求項 2 または請求項 4 に記載の形質転換植物体の子孫またはクローンである、形質転換植物体。  
15
6. 請求項 2、4 または 5 に記載の形質転換植物体の繁殖材料。

図 1

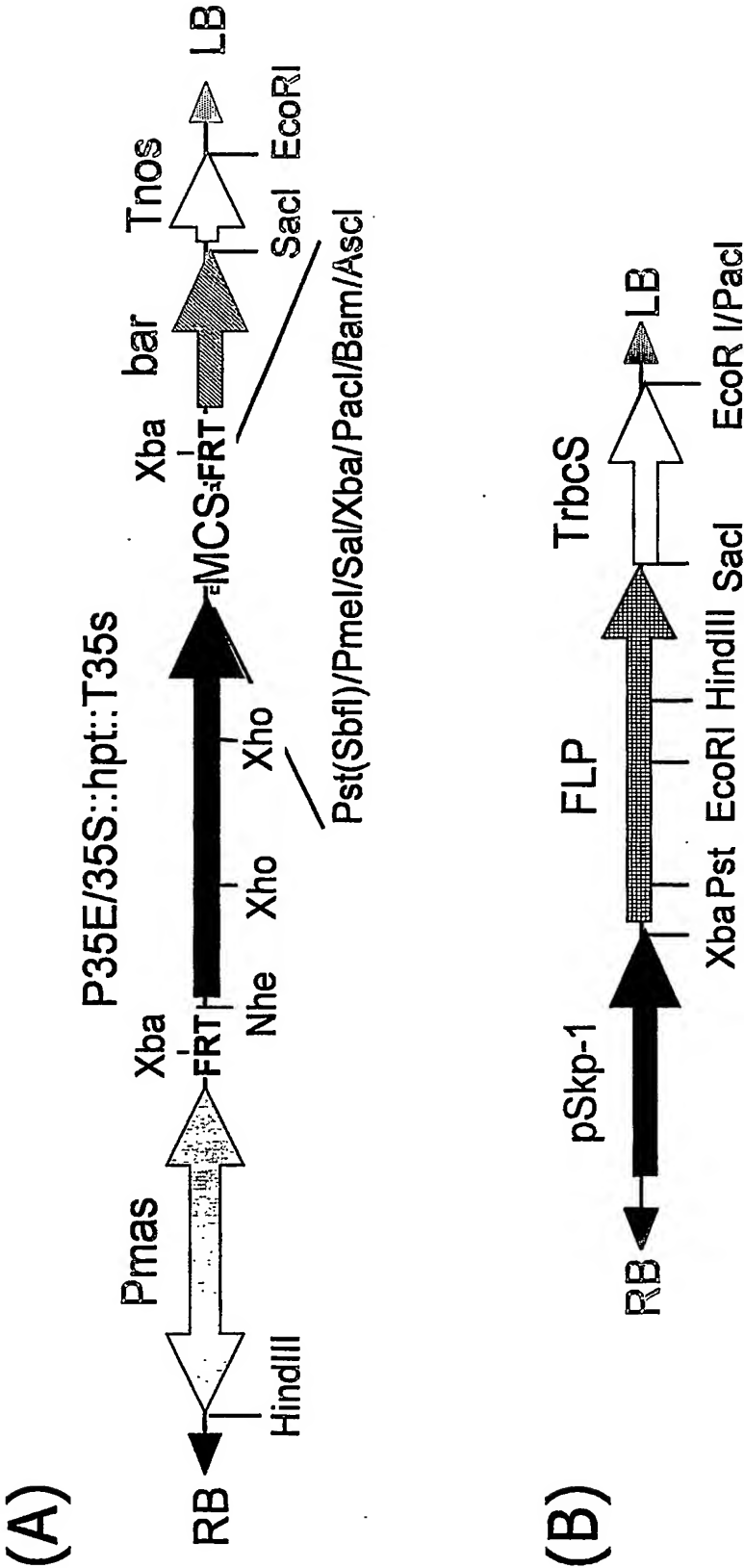
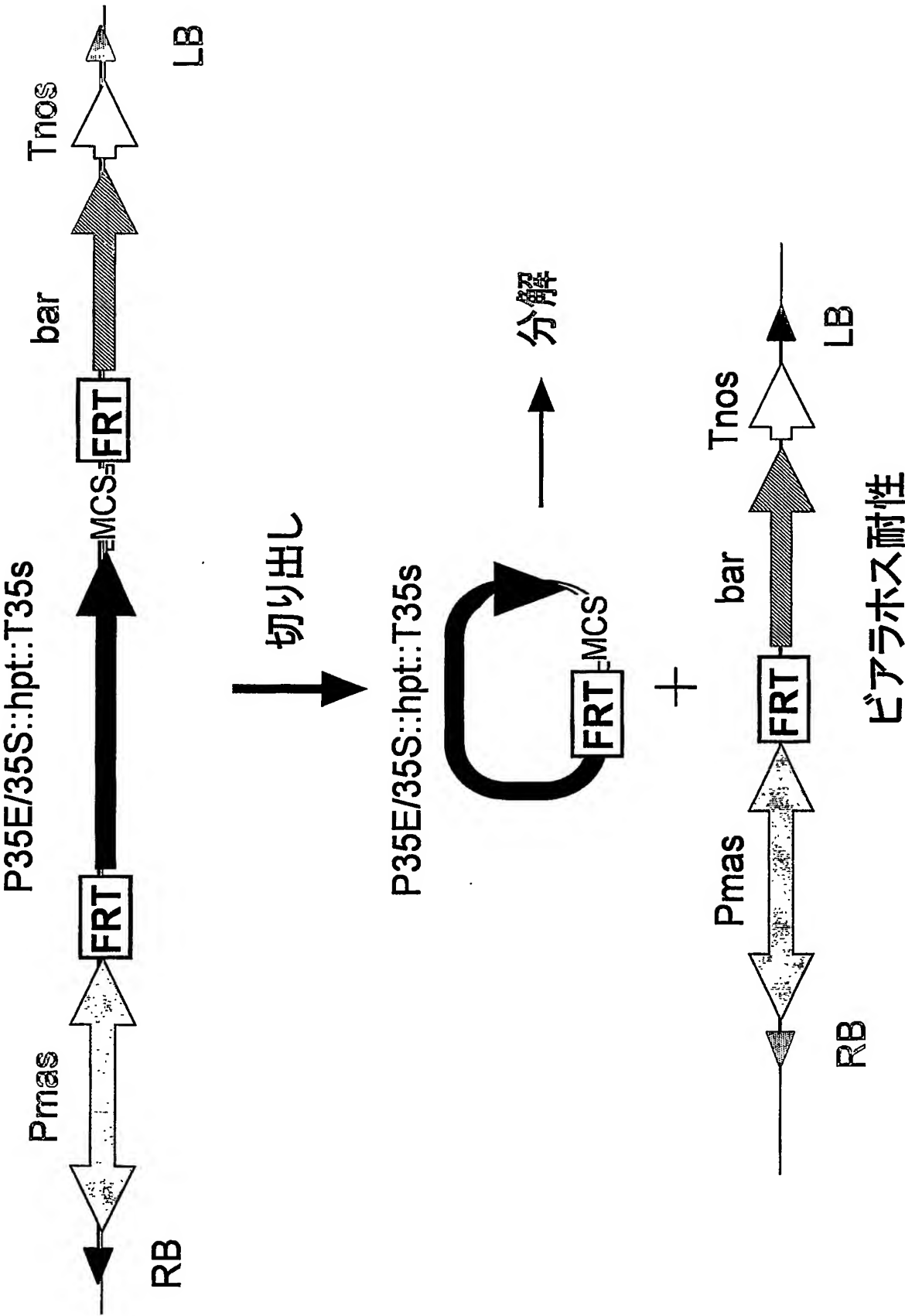


図 2





# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/003069

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/09, C12N15/82, C12N5/14, A01H5/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/09, C12N15/82, C12N5/14, A01H5/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus (STN), BIOSIS/WPIDS/MEDLINE/CA (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category*     | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages   | Relevant to claim No.    |
|---------------|--|--------------------------|
| <u>X</u><br>Y | WO 01-59086 A2 (Sakata Seed Corp.),<br>16 August, 2001 (16.08.01),<br>& WO 01/59086 A3 & US 2003/159184 A<br>& JP 2003-521940 A  | <u>1, 2, 5, 6</u><br>3-6 |
| <u>X</u><br>Y | Lyznik LA et al., Activity of yeast FLP<br>recombinase in maize and rice protoplasts.,<br>Nucleic Acids Res. (1993), Vol.21, No.4,<br>pages 969 to 675                                 | <u>1, 2, 5, 6</u><br>3-6 |
| <u>X</u><br>Y | Lloyd AM, et al., Functional expression of the<br>yeast FLP/FRT site-specific recombination system<br>in Nicotiana tabacum., Mol.Gen Genet. (1994),<br>Vol.242, No.6, pages 653 to 657 | <u>1, 2, 5, 6</u><br>3-6 |

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:  
 "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance  
 "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date  
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)  
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means  
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention  
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone  
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art  
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
05 April, 2004 (05.04.04)

Date of mailing of the international search report  
20 April, 2004 (20.04.04)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/003069

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages   | Relevant to claim No. |
|-----------|--|-----------------------|
| Y         | Reiko MOTOHASHI et al., "Shiroinunazuna ni okeru Transposon Ac/Ds o Mochiita Sonyu Hen'itai Keito no Sakushutsu", Breeding Science (1998), Vol.48, separate Vol.2, page 17 | 3-6                   |

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2004/003069

The inventions according to claims 1 to 6 relate to "a site-specific recombinase", "a site-specific recombinase recognition sequence" and "a transposon transferase". However, nothing but FLP and FRT sequence are supported by the description in the meaning within PCT Article 6 and disclosed therein in the meaning within PCT Article 5 respectively as "a site-specific recombinase" and "a site-specific recombinase recognition sequence".

Such being the case, the search was made mainly on the parts supported by the description and disclosed therein, i.e., Examples.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12N15/09, C12N15/82, C12N5/14, A01H5/00

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12N15/09, C12N15/82, C12N5/14, A01H5/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JSTPlus (STN), BIOSIS/WPIDS/MEDLINE/CA (STN)

## C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の<br>カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示   | 関連する<br>請求の範囲の番号         |
|-----------------|---|--------------------------|
| <u>X</u><br>Y   | WO 01/59086 A2 (株式会社サカタのタネ) 2001. 08. 16<br>& WO 01/59086 A3 & US 2003/159184 A & JP 2003-521940 A  | <u>1, 2, 5, 6</u><br>3-6 |
| <u>X</u><br>Y   | Lyznik LA, et. al., Activity of yeast FLP recombinase in maize and rice protoplasts.,<br>Nucleic Acids Res. (1993), Vol. 21, No. 4, p. 969-975                                | <u>1, 2, 5, 6</u><br>3-6 |
| <u>X</u><br>Y   | Lloyd AM, et. al., Functional expression of the yeast FLP/FRT site-specific recombination system in Nicotiana tabacum.,<br>Mol Gen Genet. (1994), Vol. 242, No. 6, p. 653-657 | <u>1, 2, 5, 6</u><br>3-6 |

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

05. 04. 2004

国際調査報告の発送日

20. 4. 2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

鈴木 美葉子

4 N

9 8 3 9

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

| C (続き) . 関連すると認められる文献 |  |                  |
|-----------------------|--|------------------|
| 引用文献の<br>カテゴリー*       | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示  | 関連する<br>請求の範囲の番号 |
| Y                     | 本橋令子, et. al. , シロイヌナズナにおけるトランスポゾンAc/Dsを用いた挿入<br>変異体系統の作出,<br>育種学雑誌(1998), Vol. 48, 別冊2, p. 17 | 3-6              |

請求の範囲 1－6 は、「部位特異的組換え酵素」、「部位特異的組換え酵素認識配列」、「トランスポゾン転移酵素」に係る発明であるが、しかし、PCT 6 条の意味において明細書に裏付けられ、PCT 5 条の意味において開示されているのは、「部位特異的組換え酵素」として、FLP、「部位特異的組換え酵素認識配列」としてFRT配列のみである。

したがって、調査は明細書に裏付けられ、開示されている部分、すなわち実施例を中心に行った。